



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑳ Aktenzeichen: P 39 39 973.7
㉑ Anmeld tag: 2. 12. 89
㉒ Offenlegungstag: 6. 6. 91

DE 39 39 973 A 1

㉑ Anmelder:

BASF AG, 6700 Ludwigshafen, DE

㉒ Erfinder:

Fuchs, Harald, Dr., 6719 Carlsberg, DE; Licht, Ulrike,
Dr., 6800 Mannheim, DE; Ringsdorf, Helmut, Prof.
Dr., 6500 Mainz, DE; Blankenburg, R., Dr., 6700
Ludwigshafen, DE; Ahlers, Michael, 6500 Mainz, DE

⑤④ Zweidimensional kristallisierte Makromolekülschichten

Die Erfindung betrifft zweidimensional kristallisierte Ma-
kromolekülschichten, welche unter Zuhilfenahme einer Bio-
tineinheiten tragenden lipiden Monoschicht aufgebaut sind.

DE 39 39 973 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft zweidimensional kristallisierte Makromolekülschichten, welche unter Zuhilfenahme einer Biotineinheiten tragenden lipiden Monoschicht aufgebaut sind.

Die Ausbildung kristalliner Schicht n natürlicher Makromoleküle, insbesondere von Proteinen ist von besonderem Interesse. Solche Schichten erlauben Strukturuntersuchungen dieser Stoffe, die Möglichkeit zur Analyse struktureller Zusammenhänge zwischen den Molekülen sowie gegebenenfalls die Ausarbeitung neuer Anwendungsbereiche. Gerade jedoch interessierende Proteine bilden auf natürlichem Wege keine für die Analyse geeignete Kristalle. Es hat deshalb nicht an Versuchen gefehlt, kristallisierte Proteinschichten zu erzeugen. So berichteten Uzigris & Kornberg (Nature 301 [1983] 125 – 129) von einem Verfahren zur Ausbildung zweidimensionaler Proteinschichten auf Lipidschichten. Dieses Verfahren gestattet die spezifische Bindung von Proteinen an natürliche oder synthetische im ebenen Lipidfilm vorhandene Lipidliganden. Trotz der Bereitstellung einer Reihe von kristallisierten Proteinschichten bestand jedoch der Nachteil, daß für jedes Protein ein spezifischer Lipidligand, somit ein Protein-Antigen-Paar, zur Verfügung stehen muß. In diesem Zusammenhang wurde auch die Bildung von speziellen Proteinschichten, denen des Streptavidins, mit Hilfe dieser Technik, vorgeschlagen. Dazu wurde das für die Lipidschicht vorgesehene Lipid mit einem Biotinliganden versehen, so daß sich auf Grund der besonders hohen Affinität des Biotins zum Streptavidin die Streptavidinmoleküle an die Biotinliganden der Lipidschicht anlagern können und im Wasser/Luft-Übergangsbereich eine zweidimensional kristallisierte Streptavidinschicht bilden. Die direkte Beobachtung solcher Schichten gelingt mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie, der kristallinen Charakter kann mittels Elektronenmikroskopie bestimmt werden (Blankenburg et al., Biochemistry 1989, Vol. 28, 8214).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es somit, kristallisierte Makromolekülschichten bereitzustellen, welche bisher auf einfache Weise nicht zugänglich waren.

Es wurde nun gefunden, daß sich die gestellte Aufgabe mit zweidimensional kristallisierten Makromolekülschichten lösen läßt, welche aus einer ersten, Biotin-Einheiten tragenden lipiden Monoschicht und einer zweiten, an die Biotin-Einheiten sich anlagernde und kristallisierende Schicht aus Streptavidin sowie einer über die freien aktiven Zentren der Streptavidin-Schicht aufgebauten Schicht aus einem biotinilierten Makromolekül.

Somit bestehen diese kristallisierten Makromolekülschichten aus biotinilierten Makromolekülen, welche an die Streptavidinschicht gebunden sind. In einer weiteren Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Schichten wird die Bindung indirekt über ein niedermolekulares oder polymeres Biotin-Ligand-Molekül erreicht. Die Kristallisation der zweiten Makromolekülschicht wird sowohl durch die Rezeptoraffine Bindung als auch durch die bereits vorhandene Ordnung der Streptavidinschicht induziert.

In einer besonderen Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Schichten bestehen die Makromoleküle aus Proteinen.

Die erste, die erfindungsgemäßen kristallisierten Makromolekülschichten charakterisierende Biotin-Einheiten tragenden lipide Monoschicht besteht im allgemei-

nen aus den bekannten aminofunktionellen Lipiden.

Als besonders vorteilhaft im Sinne der Erfindung haben sich hierbei Verbindungen, wie z. B. N-biotinyl(S-(1,2-bis(octadecyloxycarbonyl)ethyl)cystein, N-biotinyl-S-1-carboxy-2-((N,N-di-octadecylamino)carbonyl)ethyl)cystein, N-biotinoyl-S-1-phosphatidyl3-glycerol-dimyristoyl, N,N-di-octadecyl-N'-biotinyl-propandiamin and N,N-di-octadecyl-biotinamid erwiesen.

An diese biotinilierte Lipidschicht ist nun eine Streptavidin-Schicht über die spezifischen Rezeptoren angelagert. Streptavidin ist ein Protein, das vier identische Untereinheiten aufweist, wobei jede ein Biotinmolekül binden kann. Die nicht kovalente Bindung zwischen Streptavidin und Biotin ist bekanntermaßen eine der stärksten, der Wert K_a beträgt etwa 10^{15} mol^{-1} . Durch diese Anlagerung des Streptavidins an die Biotineinheiten der Lipidschicht entsteht eine geordnete, zweidimensionale Schicht, wie sie beispielhaft in Fig. 1 mit (A) = Lipid, (B) = Biotin und (C) = Streptavidin dargestellt ist. Auf diese Weise entstehen sehr große zweidimensionale Streptavidin-Bereiche in einer Ausdehnung von 50 bis 200 μm . Ihr Nachweis ist mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie möglich.

Mit der dargestellten Oberfläche der zweidimensional kristallisierten Streptavidinschicht wird nun die Anlagerung eines biotinilierten, wasserlöslichen Makromoleküls, insbesondere eines biotinilierten Proteins an die freien Anlagerungsstellen der Biotinoberfläche möglich. Solche wasserlöslichen Makromoleküle können biotiniliertes Poly(meth)acrylat, Polylysin, Polyvinylalkohol oder Dextran sein. Sie dienen der Verankerung eines weiteren Ligandmoleküls an die bereits kristallisierte Oberfläche. Proteine, wie z. B. biotinilierte monoklonale Antikörper oder Enzyme können direkt an die Streptavidinschicht gebunden und in überraschend einfacher Weise zu kristallisierten Schichten aufgebaut werden. Die Fig. 2 und 3 zeigen die erfindungsgemäßen Schichten, wobei X allgemein für ein Makromolekül steht und die Quadrate □ das Protein darstellen sollen.

Die derart aufgebauten zweidimensional kristallisierten Makromolekül-Schichten lassen sich dadurch erhalten, daß ein wasserlösliches Biotin-Ligand-Adaptermolekül an die Streptavidinschicht gebunden wird und damit einem weiteren Protein neue Erkennungsstrukturen zur Verfügung stellt. Auch läßt sich ein wasserlösliches Polymer mit Biotin und Ligandstrukturen an die Streptavidinschicht binden, ebenso wie sich ein biotiniliertes Protein an die Streptavidinschicht koppeln läßt. Angaben für die experimentelle Vorgehensweise finden sich u.a. in Blankenburg et al., Biochemistry 1989, Vol. 28, 8214.

Der Nachweis der so erhaltenen Schichten erfolgt in einfacher Weise durch direkte Fluoreszenzmikroskopische Beobachtung. Die Kristallinität der erhaltenen Schichten kann durch Elektronenmikroskopie nach Übertragung gemäß der Langmuir-Schäfer-Technik überprüft werden.

Die erfindungsgemäßen kristallisierten Makromolekülschichten erlauben die schnelle und einfache Bereitstellung von Proben zur Strukturuntersuchung dieser Makromoleküle, welche ansonsten nicht in kristallisierter Form vorliegen. Diese Schichten eignen sich auch zur Kontrolle enzymatischer Reaktionen, wenn der Proteintyp unter Erhalt seiner enzymatischen Aktivität an die Streptavidinschicht angekoppelt ist.

Patentanspruch

Zweidimensional kristallisierte Makromolekül-
schichten bestehend aus einer ersten, Biotin-Einhei-
ten tragenden lipiden Monoschicht und einer zwei- 5
ten, an die Biotin-Einheiten sich anlagernde und
kristallisierende Schicht aus Streptavidin sowie ei-
ner über die freien aktiven Zentren der Streptavi-
din-Schicht aufgebauten Schicht aus einem biotini-
lierten Makromolekül. 10

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG.1

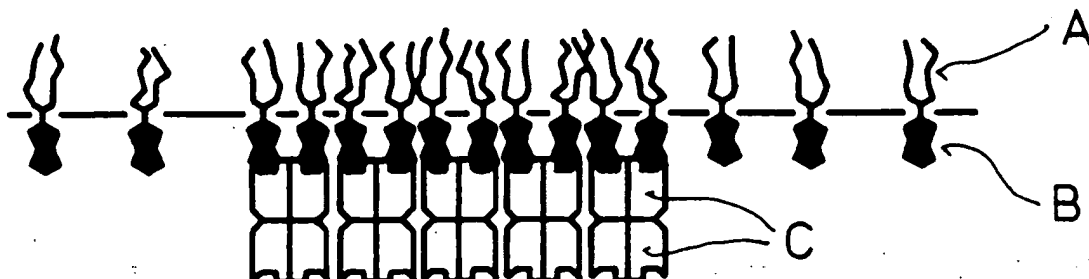


FIG.2

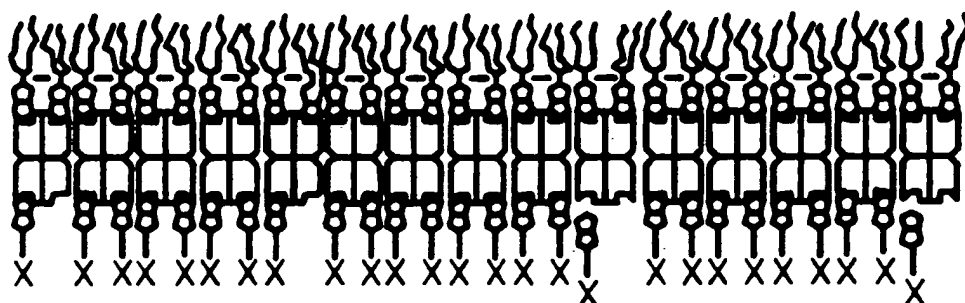


FIG.3

